

Photobiologische und photochemische Veraenderungen an Sporen von *Bacillus subtilis* nach Bestrahlung im Hochvakuum

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang - Goethe Universitaet
Frankfurt am Main

Peter-Karl-Heinrich Weber

aus Idar-Oberstein

Leiden, im August 1988

mit Genehmigung des Fachbereiches zum Druck gekuerzt. Ein Exemplar der ungekuerzten
Fassung liegt der Senckenberg-Bibliothek vor.

Photobiologische und photochemische Veraenderungen an Sporen von Bacillus subtilis nach Bestrahlung im Hochvakuum

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang - Goethe Universitaet
Frankfurt am Main**

Peter-Karl-Heinrich Weber

aus Idar-Oberstein

Leiden, im August 1988

mit Genehmigung des Fachbereiches zum Druck gekuerzt. Ein Exemplar der ungekuerzten
Fassung liegt der Senckenberg-Bibliothek vor.

Einleitung

Bakteriensporen haben sich durch ihre hochdifferenzierte Struktur und die im Vergleich zu vegetativen Zellen erhöhte Resistenz gegenüber elektromagnetischer Strahlung als hervorragende Studienobjekte für strahlenbiologische Experimente bewährt. Ausserdem erweisen sich Bakteriensporen im Vergleich zu vegetativen Bakterienzellen als wesentlich resistenter gegenüber physischem Stress, z. B. Hitze, Trockenheit, Vakuum oder Kälte. Man stellte fest, dass Bakterien- und Pilzsporen an aussergewöhnlichen Plätzen, so z.B. in grosser Höhe innerhalb der Stratosphäre (Höhen zwischen 48-77 km) und im Sediment (60 m Tiefe) von Permafrostböden der Tundra Sibiriens vorkommen. Man fand, dass Sporen, die aus diesen exotischen Umgebungen isoliert wurden, ihre Keimungsfähigkeit zum grossen Teil nicht eingebüsst hatten. Parallel zu Untersuchungen, die man in den oberen Regionen der Erdatmosphäre durchgeführt hatte, nahm man nach der Entwicklung geeigneter Träger Raketen in den fünfziger Jahren Versuche in der Raumsimulationskammer auf. Mit Hilfe dieser Experimente gelang es festzustellen, wie sich Bakterien gegenüber einer Exposition von Bedingungen des freien Weltraumes vermutlich verhalten werden. Dem Weltraum ausgesetzte Bakteriensporen erwiesen sich unempfindlich gegenüber dem dort herrschenden Hochvakuum. Wurde zusätzlich UV-Licht eingestrahlt, beobachtete man jedoch im Vergleich zu Bestrahlungen bei 1 bar eine Zunahme der UV-Empfindlichkeit um einen Faktor 10. Durch eine Anzahl weiterer Versuche fand man, dass durch die synergistische Wirkung der Weltraumfaktoren Strahlung, Druck und Temperatur eine Vielzahl von Zellschädigungen hervorgerufen werden, wie z.B. :

- DNA-Eiweiss-Vernetzungen,
- DNA-Photoprodukte und
- Membranschäden.

Darüberhinaus untersuchte man selektiv den Einfluss von:

- UV-Licht,
- Ionisierender Strahlung und
- Kosmischer Strahlung.

Um das Ausmass von Zellschäden nach Exposition an das Weltraummilieu quantitativ und qualitativ beurteilen zu können, benutzte man Mutanten-Stämme mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit. Nach Bestrahlungen mit UV-Licht in der Vakuumkammer fand man in DNA von vakuum-exponierten Bakterien

vornehmlich das Sporenphotoprodukt 5-Thyminyl-5,6-Dihydrothymin, (TDHT) , das cis,syn- und das trans,syn-Thymin-Dimere.

Der Entstehung dieser Photoprodukte liegen unterschiedliche Radikalreaktionen zugrunde. Die Bildung der Zyklobutan-Thymin-Dimere und des TDHT wurde von der Konformation der DNA waehrend der Bestrahlung beeinflusst. Die Konformation der Sporen-DNA wurde wiederum durch den Wassergehalt beeinflusst.

Problemstellung und Zielsetzung

Seit der Antike wurde der Idee der Entstehung und Fortpflanzung von Leben im Kosmos grosses Interesse gewidmet. Diese Fragestellung wurde in den letzten Jahren durch spektakulaere Ereignisse in der Astronomie, wie z. B. durch die Ergebnisse der Komet Halley-Rendezvous-Missionen (Giotto, Vega) belebt. Das gegenwaertige Interesse an dieser Thematik konzentriert sich zum grossen Teil auf die Bewertung und Weiterentwicklung bestehender Evolutionsmodelle der belebten Materie auf diesem Planeten. Um dem Problem der Widerstandsfaeigkeit von Prokaryonten unter extremen Umweltbedingungen nachzugehen, wurden Bakteriensporen in Versuchen, die sich auf UV-Bestrahlung im Welt- raum (Spacelab-1) bzw. in der Simulationskammer konzentrierten, geplant. Ausserdem wurden einige UV-Bestrahlungen bei "extrem tiefen Temperaturen" (um 10K) durchgefuehrt. Dafuer wurden im Labor fuer Astrophysik von Prof. J.M. Greenberg, Leiden, Holland, besondere Vakuumpumpstaende verwendet, mit denen die Bedingungen des interstellaren Mediums, (ISM) simuliert werden konnten. Ein Aspekt dieser Arbeit bestand darin, experimentell in Erfahrung zu bringen, wie sich das Ueberleben von Bakteriensporen unter simulierten Bedingungen des ISM, im Vergleich zum terrestrischen Milieu, veraendert. In dieser Arbeit wurden dabei zwei Extreme des ISM beruecksichtigt: zum einen das diffuse ISM und zum anderen dichte Molekulare Staubwolken mit einem hohen Anteil an kohlenwasserstoffhaltigen Molekuelen und Silikaten. Die Strategie war dabei dergestalt, dass die Wirkung einzelner Faktoren des freien Weltraumes und das Wechselspiel der Gesamtheit der Weltraumfaktoren, unter den Einschränkungen des Simulationsexperimentes, ueberprueft wurden.

Hierzu gehoerten folgende Aufgaben:

- * Aufnahme von Fluenzeffektcurven der Inaktivierung mit dem Ziel, die Wirkungsspektren der UV-Inaktivierung fuer den

Vakuum-UV-Bereich, (VUV) , sowie fuer tiefe Temperaturen zu erweitern.

- * Ueberpruefung der Reparierbarkeit von unter verschiedenen Expositionsbedingungen im Hochvakuum (HV) entstandenen UV-Schaeden,

- * Untersuchung der Wirksamkeit von Schutzsubstanzen im HV und

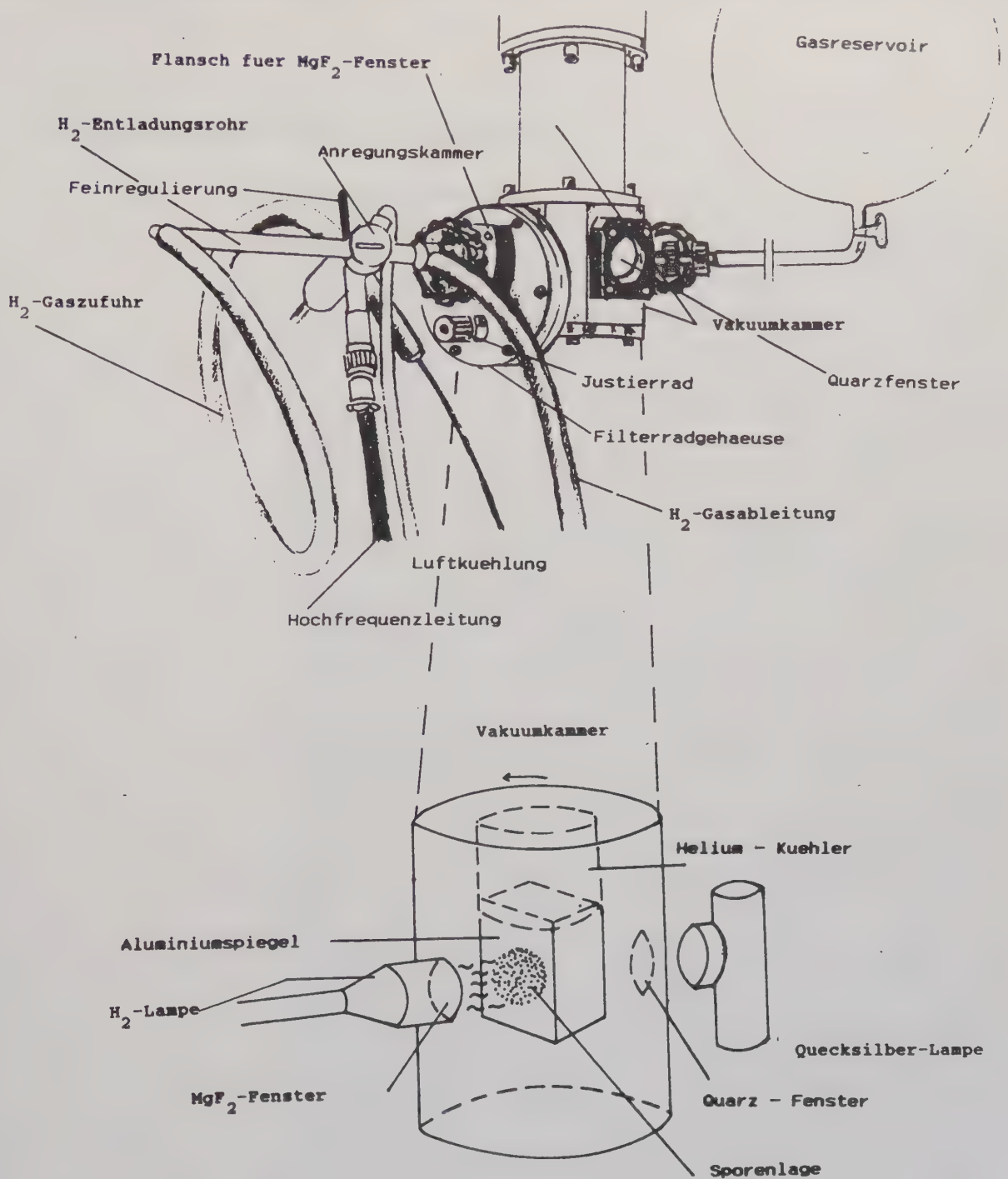
- * Bestimmung von thyminhaltigen Photoprodukten aus der DNA von Sporen, die mit UV-Licht bestrahlt worden waren und zwar im HV und bei 1bar.

Diese Untersuchungen wurden in Weltraumsimulationsanlagen und in einem Weltraumexperiment (ES029, Spacelab-1) durchgefuehrt. Es wurden Experimente ausgefuehrt, die das Vakuum-UV-Spektrum mit Wellenlaengen < 200 nm, (VUV) und das Quarz-UV mit Wellenlaengen > 200 nm, (QUV) , beruecksichtigten. Bei der Analyse von Photoprodukten wurde von einer Methode Gebrauch gemacht, die es erlaubte, DNA aus Sporen zu isolieren, ohne dabei eine Germination auszuloesen. Durch die Teilnahme als Co-Investigator an einem Weltraumexperiment (ES029) innerhalb der Spacelab-1-Mission, bot sich die Moeglichkeit, die Ergebnisse der Weltraumsimulation mit Daten, die im freien Weltraum gewonnen wurden, zu vergleichen.

Material und Methoden

Fuer die Untersuchungen im HV und im Weltraum standen verschiedene Staemme von *Bacillus subtilis* zur Verfuegung. Diese Mutantenstaemme wurden freundlicherweise von N. Munakata, Tokio, Cancer Center zur Verfuegung gestellt. Diese Mutantenstaemme waren derart konstruiert, dass sie Deletionen in Excisions-, Rekombinations- und Sporenphotoproduktreparatur in unterschiedlichen Kombinationen aufwiesen. Die Weltraum-Simulationsversuche erforderten den Aufbau einer besonderen Anlage (siehe Abb.), die Bestrahlungen bei unterschiedlichen Temperaturen mit verschiedenen UV-Quellen ermoeeglichte. Ausserdem bestand die Moeglichkeit, Gase in die Vakuumkammer einzuleiten, um Sporen mit Schutzmaenteln einfacher Molekuele zu versehen. Ein He-Ne-Laser wurde verwendet, um mittels Interferometrie die Schichtdicke der kuenstlich erzeugten Eismaentel in situ, d.h. auf der Bestrahlflaeche im HV-Pumpstand, zu bestimmen. Untersuchungen ueber UV-Strahlungseffekte in der HV-Kammer setzten eine genaue Dosimetrie voraus. Zwei Methoden wurden fuer diese Arbeit ausgewaehlt. Fuer das QUV wurde die Eisen-

Oxalat-Aktinometrie benutzt, fuer das VUV die Photolyse von CO₂. Fuer Bestrahlungen im Weltraum wurden die Bakteriensporen auf Quarzplaettchen deponiert. Dazu wurde die Konzentration der Proben optimiert. Die Dosimetrie der extraterrestrischen Solarstrahlung basierte auf Daten derselben und vorausgegangener Weltraummissionen. DNA-Photoprodukte wurden durch Duenschichtchromatographie der radioaktiv markierten, saeure-hydrolysierten Sporen-DNA nachgewiesen. Mit Hilfe eines Vakuum-UV-Filtrerrades, das mit verschiedenen Interferenzfiltern versehen war, konnten Wirkungsspektren fuer die Inaktivierung von *Bacillus subtilis* Sporen im QUV und im VUV aufgenommen werden. Um die Ergebnisse dieser Bestrahlungen erklaren zu koennen, wurde an Hand von Literatur ueber die UV-Absorption von Proteinen im HV ein UV-Absorptionsmodell fuer Bakteriensporen entwickelt. Dieses Modell beruecksichtigte die unterschiedlichen Komponenten im Aufbau einer Bakterienspore.



Vakuumpumpstand (Labor von Prof. Greenberg, Leiden, Holland) , der fuer die Raumsimulationsverduche verwendet wurde. Die Abb. zeigt die wichtigsten Komponenten des Pumpstandes und in der Durchsicht die Anordnung der Probe auf der Bestrahlflaeche.

Ergebnisse und Diskussion

UV-Bestrahlungen

Die Bestimmung der UV-Empfindlichkeit der unterschiedlichen Mutantenstämme von *Bacillus subtilis* zeigte, dass der Wildtyp-Stamm 168 gegenüber monochromatischer UV-Strahlung von 254nm einer Quecksilberniederdrucklampe (RUV) am widerstandsfähigsten war, und dass der Stamm TKJ 6323 mit Deletionen in drei Reparatursystemen > 50 mal empfindlicher reagiert. In den darauffolgenden Versuchen wurden diese beiden Stämme wegen der extremen Unterschiede in der RUV-Empfindlichkeit verwendet. Der Effekt von tiefen Temperaturen (10K) und HV ($< 1 \times 10^{-6}$ mbar) auf das Überleben von Bakteriensporen wurde mit Resultaten bei Zimmertemperatur verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Stamm 168 unter HV (294K) mindestens 4 mal empfindlicher reagiert als bei 1bar. Wurden die Proben vor der Bestrahlung auf 10K abgekühlt, beobachtete man keine Inaktivierung bei Fluenzen, die bei Zimmertemperatur letal waren. Der Trend zu geringerer UV-Empfindlichkeit zeigte sich auch bei Langzeitbestrahlungen. Bei einer Fluenz von $1 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$ und einer Bestrahlungstemperatur von 10K wurde ein Überleben von 25% der Probe festgestellt. Versuche mit dem UV-sensiblen Stamm TKJ 6323 zeigten auch für diesen ein vergleichbares Ergebnis. Dies war ein Indiz dafür, dass der bei tiefen Temperaturen durch UV entstandene Schaden den zelleigenen Reparatursystemen weniger zugänglich war als Schäden, die bei höheren Temperaturen entstanden. Um die UV-Strahlung des ISM zu simulieren, benutzte man eine Wasserstoffentladungslampe. Bestrahlungen mit dem vollen Spektrum (QUV- & VUV-Anteil) zeigten, dass Sporen durch diese Lampe sehr effizient inaktiviert werden. Kühlte man die Proben auf 10K ab, beobachtete man eine signifikante Reduktion des Strahlenschadens. Substituierte man das MgF_2 - Fenster der Lampe durch ein Quarz-Fenster, beobachtete man, dass das resultierende QUV-Spektrum ($> 200 \text{ nm}$) in der Inaktivierung der Bakteriensporen im HV vergleichbar effektiv war wie das Gesamtspektrum der Lampe ($> 121,5 \text{ nm}$). Ein Faktor, der, bezogen auf die Bedingungen des ISM, der Spore einen Schutz gegen QUV- bzw. VUV-Licht und damit wesentlich längeres Überleben unter Bedingungen des ISM bieten würde, bestand in der Aggregation eines Schutzmantels aus einfachen Molekülen. Versuche mit solchen künstlichen Eismaenteln wurden mit unterschiedlichen Schichtdicken durchgeführt. Die

Ergebnisse zeigten, dass Mixturen aus $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_4 : \text{NH}_3 : \text{CO}$ die Spore tatsaechlich gegenueber Photonen der Wasserstoffentladungslampe schuetzen. Die Ergebnisse der VUV-Versuche zeigten, dass Wellenlaengen von 140 nm bei Fluenzen in Groessenordnungen von mehreren KJ m^{-2} bei Zimmertemperatur und auch bei 10K wenig wirksam sind. Licht der Wellenlaenge 160 nm zeigte eine inaktivierende Wirkung bei 294K; allerdings benoetigte man wesentlich groessere Fluenzen als bei Verwendung des vollen Spektrums der Wasserstoffentladungslampe. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Inaktivierung von Sporen im HV durch Photonen mit Energien $< 6\text{eV}$ am wirkungsvollsten sind. Die Ergebnisse ermoeglichten, zwischen den verschiedenen Arten von Photoschaeden bei der Inaktivierung durch QUV bzw. VUV zu unterscheiden. Ein Schaden durch UV koennte ausserhalb des Kerns in den Huellen oder innerhalb des Zytoplasmas der Bakterienspore entstehen. Innerhalb des Zytoplasmas koennte man Laesionen in folgende Photoprodukte unterteilen :

- Zyklobutan-Dimere (mehrere Isomere),
- Sporenphotoprodukt (TDHT),
- DNA-Protein-Quervernetzungen,
- DNA-Strangbrueche und
- DNA-Addukte.

Ausserhalb des Zytoplasmas beschraenkt sich der Schaden auf das Zelleiweiss der Huellen anstelle von DNA, die auf das Zytoplasma beschraenkt war. Das in dieser Arbeit entwickelte UV-Absorptionsmodell bestaetigt, dass eine Energiebarriere bei der Induktion der unterschiedlichen Strahlenschaeden besteht. Waehrend Sporen fuer Photonen $< 6\text{eV}$ relativ transparent sind, errechnet man bei hoeheren Photonenenergien ($> 6\text{eV}$) eine signifikante Verringerung der UV-Transmission. Das Ergebnis der Berechnungen zeigt, dass durch die auesseren Huellen von Bakteriensporen Photonen $> 6\text{eV}$ stark absorbiert werden und daher kaum in das Zytoplasma gelangen. Dies ist eine moegliche Erklaerung dafuer, dass die Spore gegen VUV besser gefeit ist als gegen Photonen des QUV. Das Ergebnis dieser Berechnungen stimmt mit den im VUV gemessenen Werten der Fluenzeffektkurven sehr gut ueberein. Darueberhinaus dient es auch als Erklaerung fuer ein weitaus besseres Ueberleben von Sporen, die vor der UV-Bestrahlung mit einem kuenstlichen Eismantel versehen worden waren. Die Molekuele des Eismantels auf Sporen absorbieren VUV vergleichbar intensiv wie Peptidbindungen von Aminosaeuren.

Astrophysikalische Relevanz der UV-Bestrahlungen

Aus Daten neuester Veröffentlichungen wurde deutlich, dass die Gesamtenergie von Photonen mit Wellenlängen $< 200\text{nm}$ und Photonen mit Wellenlängen $> 200\text{ nm}$ im ISM ungefähr im Verhältnis 1 : 1.1 verteilt ist. Unter Berücksichtigung der in der rezenten Literatur angegebenen UV-Fluenz-Werte für das ISM und Ergebnissen aus den Bestrahlungsversuchen dieser Arbeit, kam man auf ein kalkultiertes 1%iges Überleben von Bakteriosporen im diffusen ISM bereits nach einer Expositionsdauer von ca. 150 Jahren. Allein durch Aggregation eines komplexen Eismantels und unter der Annahme, dass sich Sporen in einer dichten molekularen Staubwolke befinden, kam man auf ein kalkultiertes Überleben von maximal einigen Millionen Jahren. Diese Werte basieren auf Berechnungen, die eine Inaktivierung auf 10%iges Überleben zugrundelegen.

Photoprodukte

Von den oben aufgeführten DNA-Photoprodukten zeigte sich in Sporen nach Bestrahlung mit UV-Licht bei 1 bar hauptsächlich das TDHT und unter Vakuum das ansonsten nur in geringsten Konzentrationen beobachtete trans,syn-Dimere. Im Weltraumversuch Spacelab-1, ES029 wurden Bakteriosporen sowohl bei 1 bar als auch unter dem lokalen Vakuum mit Solar-UV (SUV) bestrahlt. Das Ergebnis der SUV-Bestrahlungen stimmt qualitativ mit den RUV-Bestrahlungen in der Simulationsanlage überein. Quantitativ beobachtete man im Weltraumversuch eine deutliche Verringerung von TDHT unter Vakuum und damit korreliert eine starke Ausprägung des trans,syn-Dimeren - Gipfels. Diese Ergebnisse aus der Duennschichtchromatographie führten zu der Annahme, dass die Konformation der DNA im Zytoplasma der Bakteriospore unter HV die Entstehung von TDHT gegenüber dem in vegetativen Zellen dominanten cis,syn-Dimeren begünstigt. Bei geringer rel. Feuchte ($< 65\%$) verändert sich die Konformation dieses Makromoleküls von der B-Form zur A-Form. Liegt DNA in A-Form vor, wurde beobachtet, dass die Konzentration von Protein-Eiweiß-Vernetzungen und TDHT zunimmt. Die Photochemie im Vakuum war, im Vergleich zu Bestrahlungen bei 1 bar, wesentlich anders. Die DNA war durch die Vakuum-Exposition partiell denaturiert. Dies war, nach Beobachtung vieler Autoren, Voraussetzung für die Bildung des trans,syn-Dimeren.

Die photochemischen Reaktionen veraendert sich von der bei 1bar vorherrschenden an B-DNA-Konformation beobachteten Triplett-Anregung weg zur Ionisation von Pyrimidin-Basen an A-DNA im HV. Dies verursachte , wie am Beispiel der Entstehung von TDHT belegt, eine Reaktion an Pyrimidin-Basen unter Abspaltung und Umlagerung von Protonen.

Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ermoeglichten eine Abschaetzung der Ueberlebenschancen fuer Bakteriensporen in einem extrem lebensfeindlichen Milieu, dem freien Weltraum. In den Versuchen gelang es, mit Hilfe eines dafuer entwickelten Pumpstandes, die Bedingungen des ISM in den Grenzen des technisch Machbaren zu simulieren. Generell beobachtete man, dass die UV-Empfindlichkeit der Bakteriensporen im HV zu kuerzeren Wellenlaengen hin abnahm. Im HV zeigte sich, dass die UV-Empfindlichkeit im QUV generell hoeher ist als bei 1 bar. Quantitativ beobachtete man im QUV eine Steigerung der UV-Empfindlichkeit um 2 bis 3 Groessenordnungen, gegenueber Bestrahlungen bei 1 bar. Im VUV dagegen erschien die UV-Empfindlichkeit, unabhaengig vom Druck, zu kuerzeren Wellenlaengen hin abnimmt. Bei tiefen Temperaturen (um 10K) im HV beobachtete man einen signifikanten Anstieg der UV-Resistenz von Sporen, sowohl gegen VUV als auch QUV, unabhaengig von dem Reparaturvermoegen der Zelle und der Wellenlaenge. Die Analyse der DNA-Photoprodukte zeigte, dass durch UV-Licht unter Vakuum andere chemische Reaktionen beguenstigt werden als bei 1 bar.

Dekan: Prof. Dr. T. Butterfass
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.D. Mennigmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Buecker

Prozeduren: 06.07.88

Curriculum vitae

Name : Peter-Karl-Heinrich Weber

Beruf : Dipl. Biologe

geboren am : 22. 03. 1949

Geburtsort : Idar-Oberstein

Nationalitaet : Deutsch

Familienstand : verheiratet, 1 Kind

1955 - 1960 Volksschule in Idar-Oberstein

1960 - 1970 Gymnasium in Idar-Oberstein

1970 - 1978 Studium der Biologie an der Johann-Wolfgang
Goethe Universitaet, Frankfurt am Main

1979 Studienabschluss mit einem Diplom am
Fachbereich Biologie der Universitaet Frankfurt

1979 - 1980 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Paul-Ehrlich
Institut, Frankfurt am Main

1980 - Doktorand in der Arbeitsgruppe Biophysikalische
Raumforschung, Prof. Dr. H. Buecker

1983 - 1985 Fellowship der Europaeischen Weltraumbehoerde,
ESA , am Huygens Institut, Laboratorium Astro-
physik, Prof. J.M. Greenberg

1985 - 1986 Fellow der ESA im technischen Zentrum,
Noordwijk (ESTEC) in der Microgravity and
Payload Division, Dr. Martinides

1986 - 1988 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Huygens-Laboratorium, Lab. Astrophysik,
Prof. J.M. Greenberg

Peter Weber

